

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC – UFABC
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO PARA BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

PAULO ROBERTO TOBARO CRUDE

Análise filogeográfica de *Heterotermes longiceps* (Snyder, 1924)
(Isoptera: Rhinotermitidae)

Santo André

2017

PAULO ROBERTO TOBARO CRUDE

**Análise filogeográfica de *Heterotermes longiceps* (Snyder, 1924)
(Isoptera: Rhinotermitidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do ABC – UFABC, como requisito para obtenção do grau em bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Fernandes Carrijo

Santo André

2017

PAULO ROBERTO TOBARO CRUDE

**Análise filogeográfica de *Heterotermes longiceps* (Snyder, 1924)
(Isoptera: Rhinotermitidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do ABC – UFABC, como requisito para obtenção do grau em bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Fernandes Carrijo

BANCA EXAMINADORA

Me. Bruno Garcia Piato

Universidade: Universidade Federal do ABC

Ma. Rafaella Gregorio Santos

Universidade: Museu da Universidade de São Paulo

Profª. Dra. Márcia Aparecida Sperança

Universidade: Universidade Federal do ABC

Santo André

2017

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”
(Albert Einstein)

RESUMO

A espécie sul-americana de cupim (ou térmita) *Heterotermes longiceps* (Snyder, 1924) (Isoptera, Rhinotermitidae) vive em ninhos dispersos no solo, sendo considerados cupins subterrâneos. São cupins xilófagos e podem adquirir o status de praga. Sua distribuição conhecida abrange o norte da Argentina, Paraguai, Bolívia, sul do Cerrado brasileiro e Mata Atlântica. Este projeto buscou realizar uma análise filogeográfica dessa espécie, visando inferir sua história evolutiva considerando sua distribuição geográfica. Utilizando amostras de boa parte da sua distribuição, foram realizadas as extrações de DNA; isolamento dos genes mitocondriais 16S rRNA e COII (Citocromo Oxidase II) e posteriormente amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Após a purificação dos produtos, os quais foram enviados ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP de Jaboticabal, obteve-se as sequências nas direções *forward* e *reverse*. Foram realizados os alinhamentos gerando as fitas consenso para cada gene e amostra. Análises filogenéticas para os dois genes foram realizadas pelo método de inferência bayesiana e também foi feita uma rede de haplótipos. Além de proporcionar uma distribuição geográfica complementar a publicações anteriores, este trabalho definiu três populações distintas a partir de padrões encontrados no cladograma e rede gerados. Um dos grupos (grupo Z) aparentemente está restrito no Espírito Santo e porção extremo sul da Bahia, enquanto os outros dois grupos se distribuem na parte sul da Diagonal de Formações Abertas da América do Sul, além de Espírito Santo, Paraíba e Maranhão. Para o grupo Z, levantou-se a hipótese que o seu isolamento teria se dado pela separação da Mata Atlântica de outras florestas sul-americanas após a expansão das grandes áreas abertas savânicas no Plioceno e também pela divisão do bioma pelo vale do Rio Doce, originando a área de endemismo do grupo; outra hipótese foi levantada para as outras duas populações, de que possivelmente se estabeleceram na Diagonal de Formações Abertas da América do Sul com posterior dispersão para as áreas de florestas, e talvez devido a atividade humana para o Maranhão; contribuindo assim, com novas informações de *Heterotermes longiceps*.

Palavras-chave: Genética de populações, Filogenética, Distribuição Geográfica

ABSTRACT

The south american termite species *Heterotermes longiceps* (Snyder, 1924) (Isoptera, Rhinotermitidae) lives in nests diffused on the soil, thus considered subterranean termites. They are xylophagous termites and can acquire pest status. Its known distribution covers the north of Argentina, Paraguai, Bolivia, south of Brazilian Cerrado and Atlantic Forest. This project sought to perform a phylogeographic analysis of this species aiming to infer its evolutionary history considering its geographic distribution. Using samples from a great part of its distribution, extractions of DNA were performed; isolation of mitochondrial genes 16S rRNA and COII (Cytochrome Oxidase II) and posteriorly amplification through Polymerase Chain Reaction (PCR). After the purification of the products, which were sent to the Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) of UNESP in Jaboticabal, sequences on both directions, forward and reverse were obtained. Alignments were performed, generating the consensus sequences to each gene and sample. Phylogenetic analysis for both genes were performed under bayesian inference and a haplotype network was constructed. Besides providing a supplementary geographic distribution to previous publications, this work defined three distinct populations from patterns found in the cladograms and network generated. One of the groups (group Z) apparently is restrict in Espírito Santo and in the extreme south portion of Bahia, while the other two groups covers the south of the South American Diagonal of Open Formations, as well as Espírito Santo, Paraíba and Maranhão. For the group Z, it was raised the hypothesis that its isolation would have occurred due to the separation of the Atlantic Forest from other South American forests, after the expansion of the large open savanna areas at the Pliocene and also due to the division of the biome by the Rio Doce valley, originating the area of endemism of the group. Another hypothesis was raised for the other two populations, that they possibly have established at the South American Diagonal of Open Formations with further dispersion to forest areas, and maybe due to human activity to Maranhão; thus contributing with new information of *Heterotermes longiceps*.

Keywords: Genetics of populations, Phylogenetics, Geographic Distribution

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	8
2.OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3.METODOLOGIA	13
3.1. Amostragem.....	13
3.2. Dados moleculares.....	13
3.3. Análises dos dados moleculares.....	16
4.RESULTADOS	18
5.DISSCUSSÃO	25
6.CONCLUSÃO	27
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
8.ANEXOS	32

1.INTRODUÇÃO

Os cupins, também conhecidos por térmitas, siriris e aleluias, pertencem ao grupo Isoptera. Eles são insetos hemimetábolos, ortopteroides e todas as espécies dentro do grupo são consideradas eussociais, ou seja, apresentam divisão reprodutiva do trabalho, sobreposição de gerações e cuidado cooperativo com a prole (Wilson, 1971). Assim como as formigas e abelhas, os cupins possuem indivíduos com funcionalidades diferentes de acordo com a casta, vivendo em uma colônia. No caso dos cupins, estas funções podem ser reprodutivas (rainha, rei e ninfas), de proteção (soldados) e da construção da colônia, manutenção e forrageamento (operários) (Bignell, 2006). Os cupins apresentam importantes papéis no cenário ecológico e econômico, atuando em vários ecossistemas como “super decompositores” e como auxiliares no balanço Carbono-Nitrogênio (Higashi & Abe, 1997), eles participam do processo de ciclagem de nutrientes, formação e aeração do solo, e são considerados engenheiros de ecossistema, criando, modificando e fazendo a manutenção de habitats (Lawton, 1994; Lavelle et al., 1997). São também considerados pragas de madeira e outros materiais celulósicos, sendo que nos Estados Unidos podem causar mais danos econômicos que fogo e enchentes combinados, principalmente por deixar grandes estragos nas madeiras estruturais domésticas (Bignell, 2006).

O posicionamento filogenético dos cupins tem sido há muito tempo debatido, sendo que atualmente resta pouca dúvida de que os cupins estão dentro do grupo das baratas (Blattaria ou Blatoidea) (Inward et al., 2007; Engel & Krishna, 2011; Beccaloni & Eggleton, 2011). Isoptera é grupo irmão de Cryptocercidae (uma das famílias de baratas) e, caso não seja considerado um grupo interno de baratas, torna Blattaria um grupo parafilético (Djernaes et al., 2012). Atualmente em Isoptera existem mais de 3000 espécies descritas com prováveis 500 a 1000 espécies ainda não descritas no mundo (Constantino & Acioli, 2006). A classificação mais aceita no momento considerando representantes vivos, reconhece nove famílias, Archotermopsidae, Hodotermitidae, Kalotermitidae, Mastotermitidae, Stolotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae, Stylotermitidae e Termitidae (Krishna et al., 2013). A espécie alvo deste trabalho, *Heterotermes longiceps*, (Snyder, 1924), está inserida na família Rhinotermitidae.

A família Rhinotermitidae compreende muitas das espécies comumente chamadas de “cupins subterrâneos” e é a família de cupins mais amplamente distribuída no mundo, com

espécies ocorrendo desde regiões tropicais, até temperadas (Eggleton, 2000). São conhecidos especialmente pelo seu potencial como praga, podendo causar enormes prejuízos econômicos para os seres humanos (Constantino, 2002; Vargo & Hussneder 2009).

O Gênero *Heterotermes* Froggatt, 1900 compreende mais de 50 espécies descritas no mundo, sendo que nove delas ocorrem na região Neotropical, e cinco na América do Sul. São abundantes em ambientes naturais e urbanos e podem ter importância como pragas na agricultura e de estruturas. *Heterotermes* e *Reticulitermes* Holmgren, 1913 são atualmente os únicos gêneros colocados em Heterotermitinae, sendo que *Reticulitermes* está restrito à zona temperada nortenha, enquanto *Heterotermes* é essencialmente tropical (Constantino, 2000).

Há pouca informação na literatura sobre a espécie em foco deste trabalho – *Heterotermes longiceps* – sendo que a primeira compilação com a distribuição geográfica da mesma foi publicada por Constantino (2000) (figura 1). Essa espécie, juntamente com outras espécies de *Heterotermes* descritas até então, foram inicialmente descritas como pertencentes do gênero *Leucotermes* Silvestri, 1901, e posteriormente realocadas em *Heterotermes* por Light em 1933. Dentro do gênero, *H. longiceps* é a segunda espécie na América do Sul em abundância e amplitude de sua distribuição geográfica (Constantino, 2000).

Sabe-se que há um dimorfismo presente na casta dos soldados de duas espécies do gênero, *H. longiceps* e *H. tenuis*, porém, na primeira é mais aparente, com diferenças maiores em relação ao tamanho da cabeça e pronoto, podendo facilmente reconhecer soldados maiores e menores (figura 2). Constantino (2000), observou que o soldado maior de *H. longiceps* pode apresentar amplas variações, especialmente em relação ao comprimento da cabeça, sendo que os espécimes do centro brasileiro tendem a ter cabeças mais compridas, enquanto que os da região costeira têm cabeças mais curtas e largas. Essa mesma variação não ocorre nos soldados menores da espécie.

A filogeografia é o estudo dos princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (Avice et al., 1987). Ela lida com as relações filogenéticas de linhagens intraespecíficas ou de espécies próximas, baseada na distribuição espacial de genealogias gênicas (estudos microevolutivos) e pode fazer uma ponte entre micro e macroevolução (Avice, 2000). As premissas para as inferências filogeográficas são: espécies/populações podem ser estruturadas geograficamente; espécies/populações sem estruturação possuem alto fluxo gênico entre subpopulações; grupos monofiléticos altamente divergentes dentro das espécies são produtos de barreiras ao fluxo gênico (Avice et al., 1987).

Este trabalho propõe utilizar a filogeografia como ferramenta para ajudar a compreender a história evolutiva de *Heterotermes longiceps*.

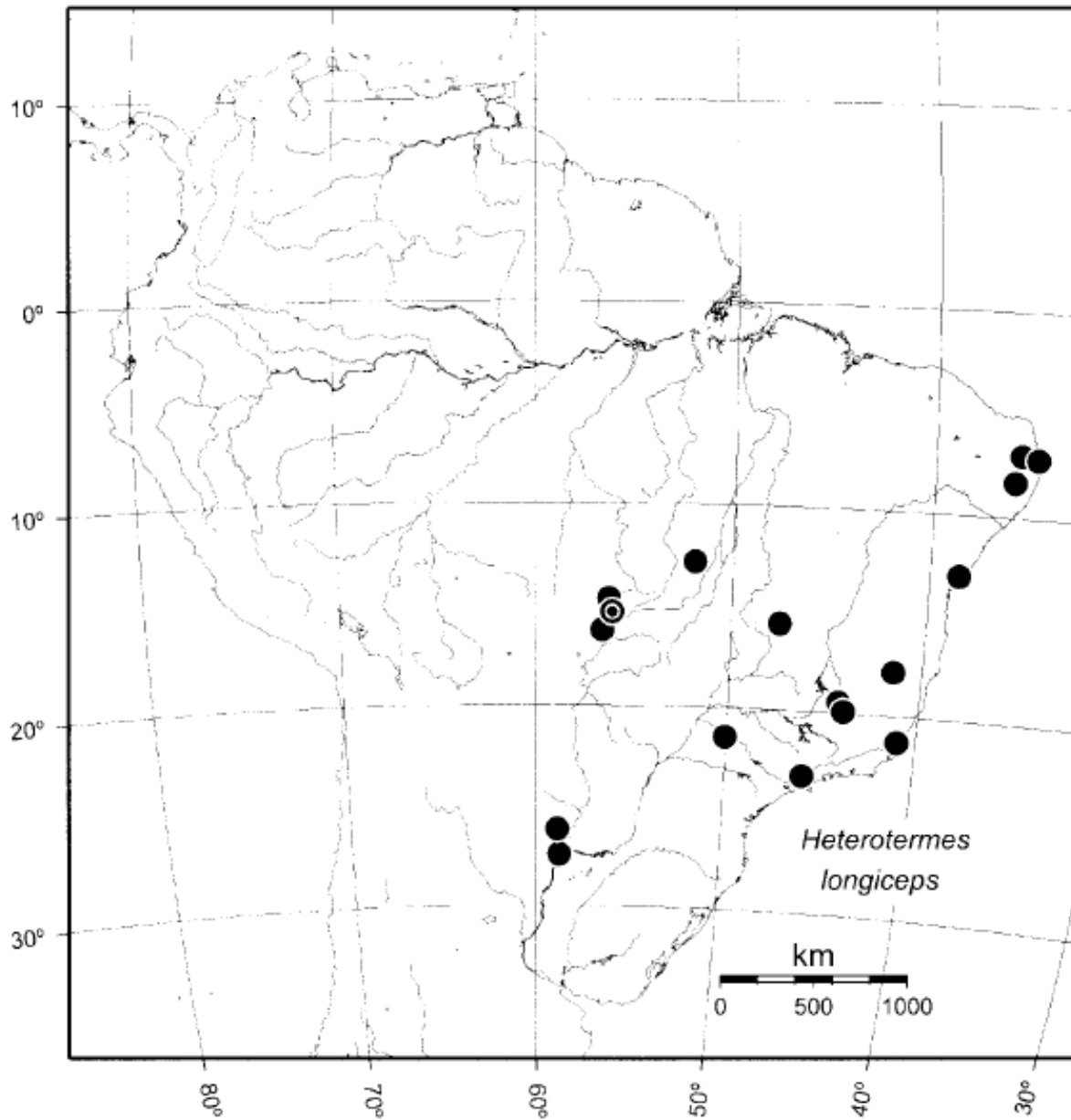


Figura 1 – Distribuição geográfica de *Heterotermes longiceps* na América do Sul (Figura retirada de Constantino, 2000).

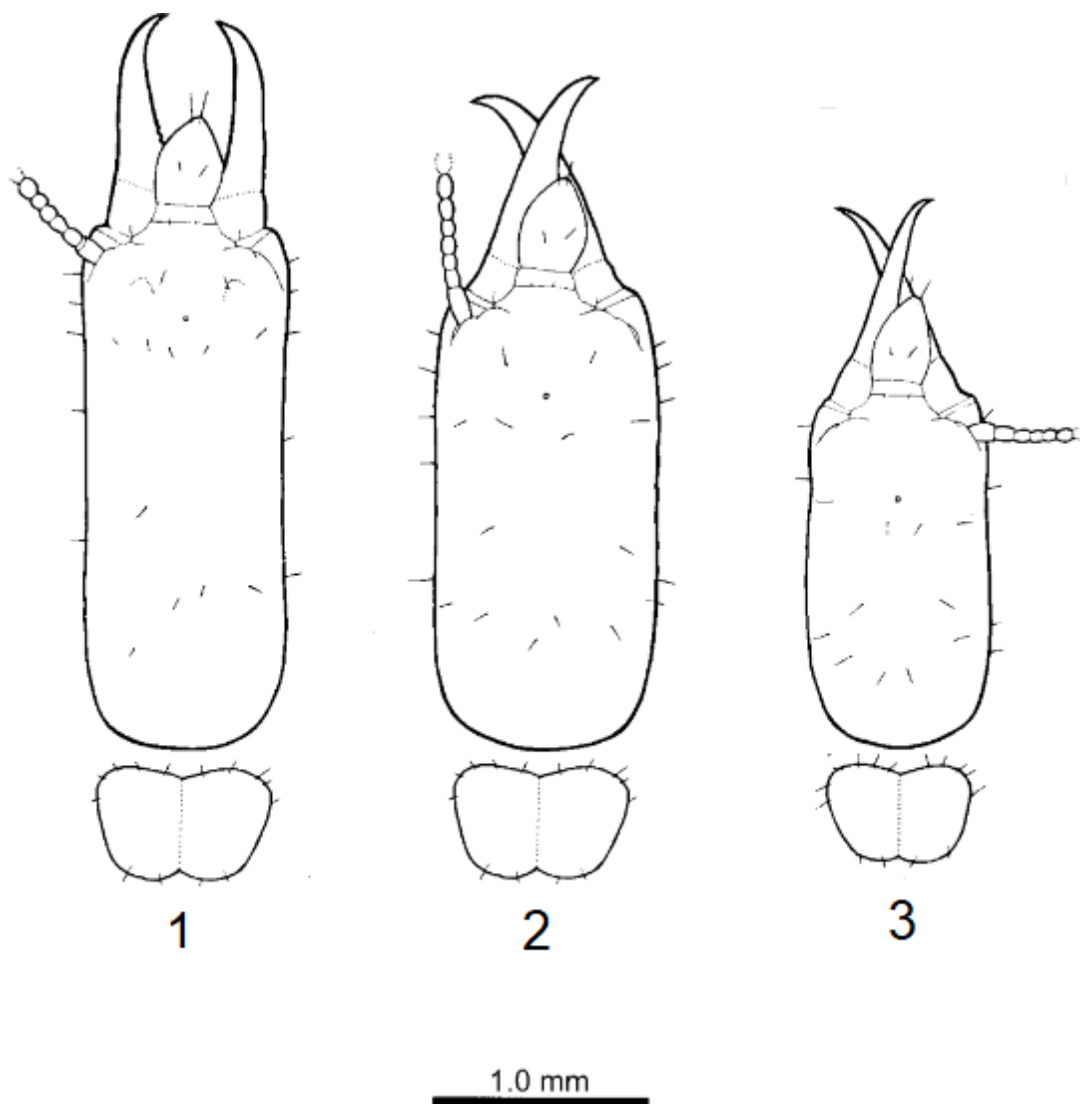


Figura 2 – Visão dorsal de soldados de *Heterotermes longiceps* mostrando o dimorfismo em relação ao tamanho da cabeça e pronoto da espécie: (1 e 2) soldados maiores de Brasília e Espírito Santo, respectivamente; (3) soldado menor sem localização descrita. (Figura retirada de Constantino, 2000).

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo realizar uma análise filogeográfica da espécie *Heterotermes longiceps* com a finalidade de entender a história evolutiva da mesma na América do Sul.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização genética da espécie *Heterotermes longiceps*;
- Complementação da distribuição geográfica descrita;
- Testar hipóteses de isolamento entre diferentes populações;
- Auxiliar trabalhos futuros a partir de novas informações sobre a espécie, ainda pouco conhecida.

3.METODOLOGIA

3.1 Amostragem

Todas as amostras utilizadas neste trabalho estão depositadas no acervo de Isoptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), preservadas em álcool 80% e com duplicatas em 90 – 100%, para estudos moleculares. Foram estudadas amostras de 11 Estados brasileiros (Bahia, Maranhão, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraíba, Maranhão e Ceará), além de Paraguai e Bolívia, fornecidas pelo Prof. Dr. Rudolf Scheffrahn da Universidade da Flórida.

3.2 Dados moleculares

Para a obtenção dos dados moleculares, foram utilizados dois genes mitocondriais, o gene 16S rRNA (74 amostras) e o gene COII (Citocromo Oxidase II) (58 amostras) (Anexo 1). Para a extração do DNA, a partir de um único indivíduo da colônia (cabeça e tórax de soldados ou operários), foi utilizado o kit de extração *Dneasy Blood & Tissue* – QIAGEN, seguindo as instruções do mesmo. Posteriormente foram realizados o isolamento da região do DNA de interesse e as amplificações através de reações em cadeia de polimerase (PCR), com o auxílio de um termociclador, o qual já possui programas padrões (descritos abaixo) conforme os genes utilizados, além do uso do reagente *Master Mix (Prodimol)* e dos *primers* LRJI 3007 e LRNI 1398 (sequências “TTACGCTGTTATCCCTAA” e “CGCCTGTTTATCAAAAACAT” respectivamente) para 16S rRNA (Szalanski et al., 2004); A-tLeu (Modified) e B-tLys (sequências “CAGATAAGTGCATTGGATTT” e “GTTTAAGAGACCAGTACTTG” respectivamente) para COII (Liu & Beckenbach, 1992; Simon et al., 1994).

Para o gene 16S rRNA, o programa do termociclador inicia uma desnaturação com uma temperatura de 94°C durante 2 minutos, seguido de desnaturação final com a mesma temperatura por mais 1 minuto. O anelamento ou hibridização ocorre em temperatura de 50°C por 1 minuto. A polimerização ou extensão inicial ocorre em temperatura de 72°C por 1 minuto e 15 segundos seguido de extensão final com a mesma temperatura por mais 7 minutos. Para o gene COII (Citocromo Oxidase II) o programa do termociclador inicia uma

desnaturação com uma temperatura de 94°C durante 3 minutos, seguido de desnaturação final com a mesma temperatura por mais 30 segundos. O anelamento ou hibridização ocorre em temperatura de 45°C em 1 minuto. A polimerização ou extensão inicial ocorre em temperatura de 72°C por 3 minutos seguido de extensão final com a mesma temperatura por mais 10 minutos. Em ambos os genes, há a realização de 35 ciclos. O resultado dos produtos do PCR foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose 2% e as amostras que resultaram em bandas foram utilizadas para sequenciamento (figuras 3 e 4).

Os fragmentos de DNA isolados obtidos na PCR foram purificados utilizando o reagente *ExoSap* (*GE Technology Infrastructure*), conforme as orientações do fabricante. O material obtido foi enviado ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP de Jaboticabal, para realização do sequenciamento dos fragmentos em ambas as direções (*forward* e *reverse*). O sequenciamento foi realizado através de um sequenciador automático de DNA *ABI Prism 377* (*Applied Biosystems, CA*) utilizando o kit de sequenciamento *Big Dye* (*Perkin-Elmer*) conforme as instruções do fabricante. As fitas consenso foram montadas e editadas no programa *Geneious 9.0* (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012) na direção *forward*, e alinhadas pelo plugin do *MUSCLE 3.6* (Edgar, 2004) contidos no mesmo programa, sendo editadas posteriormente por inspeção visual.

O processo foi repetido para todas as amostras de ambos os genes e posteriormente foi realizado um alinhamento de todas as amostras para cada gene. Em algumas amostras não foi possível fazer o alinhamento e foram descartadas. Houveram também amostras que foram caracterizadas como sendo pertencentes de outras espécies, por meio de comparação com outras sequências disponíveis, também sendo descartadas da análise.

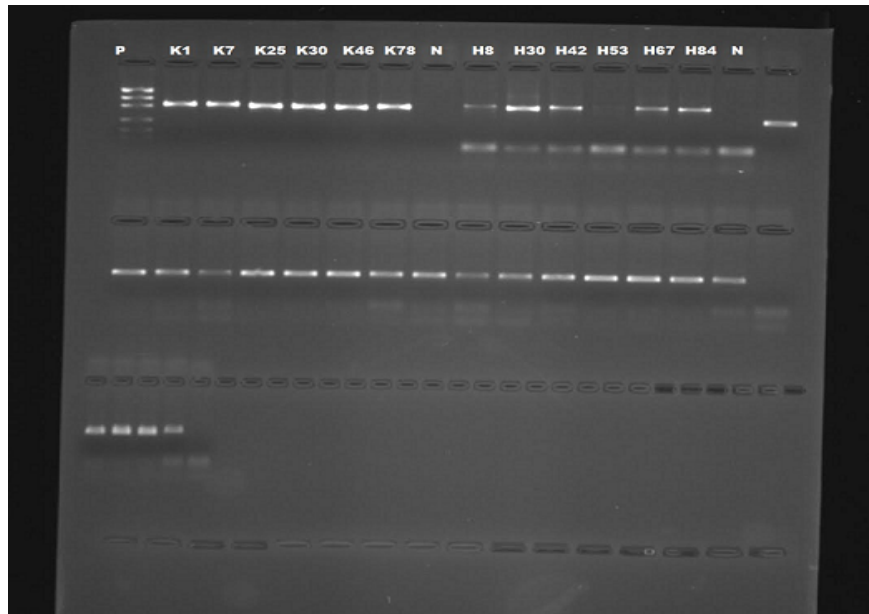


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose de 16S rRNA

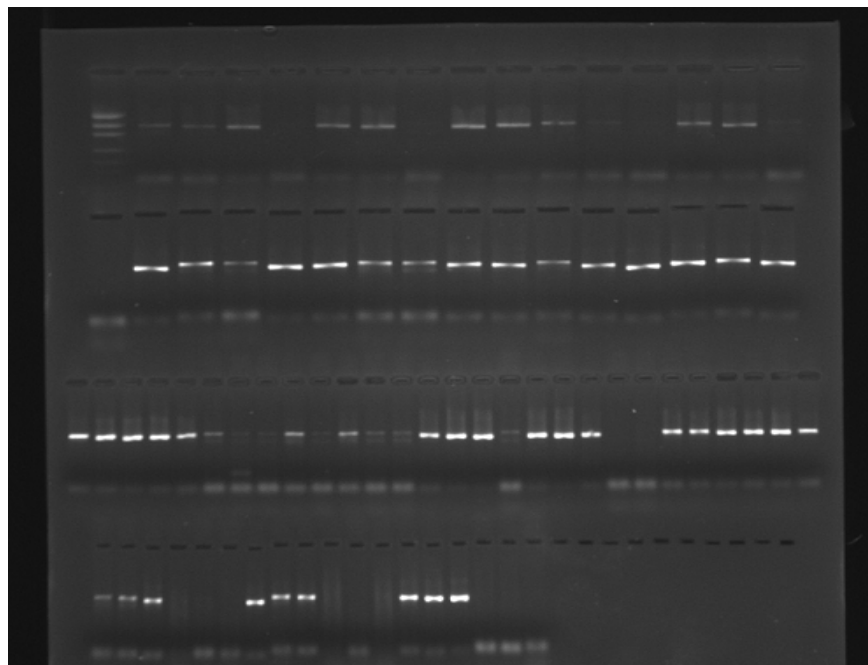


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose de COII

3.3 Análises dos dados moleculares

A partir do alinhamento múltiplo com todas as amostras viáveis para cada gene, iniciou-se o processo de reconstrução filogenética com o método probabilístico de inferência bayesiana, com o objetivo de entender a história evolutiva da espécie e as relações evolutivas entre as populações de diferentes localidades da mesma.

Primeiramente foi escolhido o melhor modelo de substituição de nucleotídeos para cada gene com o auxílio do programa *JModelTest 2.01*, utilizando o *BIC* (*Bayesian Information Criterion*, ou Critério de Informação Bayesiana, em português) (Darriba et al., 2012). Obteve-se o modelo HKY + I + G para o gene 16S rRNA e o modelo HKY + I para o gene COII.

Com os modelos já definidos para ambos os genes e com os arquivos dos alinhamentos obtidos pelo *Geneious 9.0* (e seu algoritmo *MUSCLE 3.6*), foram gerados os arquivos *.XML* no programa *BEAUti 1.8.0*. Para ambos os genes foi estipulada uma taxa de mutação constante, usando o relógio estrito (Strict Clock) e sob o modelo de coalescência (Kingman, 1982). Foram feitas cadeias de comprimento de 10 e 50 milhões para COII e 16S rRNA, respectivamente. Estes arquivos foram utilizados para fazer uma análise no programa *BEAST 1.8.0* (Drummond et al., 2012). A partir dos arquivos *.log* gerados pela análise, foi feita a checagem de convergência e estabilização pelo programa *Tracer v1.5* (Rambaut & Drummond, 2007). Após a checagem, usando os arquivos *.tree* pelo programa *TreeAnnotator v1.8.0* (Drummond et al., 2002), foi realizada a procura pela árvore com máxima credibilidade (maximum credibility tree) para ambos os genes, juntamente com duas amostras de outras espécies, uma de *H. tenuis* e outra de *H. crinitus* para servirem como grupo externo, e essas foram visualizadas com o auxílio do programa *FigTree v1.3.1* (Drummond et al., 2002) (figuras 5 e 6).

Para auxiliar na visualização de padrões e para um melhor entendimento da distribuição geográfica juntamente com as árvores obtidas foram realizadas construções de redes de haplótipos para os dois genes trabalhados (16S rRNA e COII). Para isso, foi utilizado o programa *R* (Core Team R, 2016), usando as funções *haplotype* e *haploNet*, do pacote *pegas* (Paradis, 2010) (figuras 7 e 8).

Os grandes grupos definidos para cada um dos genes também foram utilizados e separados no programa *DNAsp v6.10.01* (J. Rozas et al., 2017) para a criação de arquivos

.hap e *.arp*. Com estes arquivos gerados, foram realizadas Análises de Variância Molecular (AMOVA) através do programa *Arlequin 3.5* (Excoffier & Lischer, 2010) com a finalidade de verificar a estrutura genética das populações dentro da espécie, juntamente com testes de significância das estatísticas F. Esses resultados de estrutura genética realizados com a ajuda do programa *Arlequin* mostram a variação inter/intrapopulacional, determinando a quantidade de fluxo gênico entre as populações predeterminadas. Para as AMOVA realizadas o número de permutações foi 1000, sob o método de *Pairwise difference* e as distâncias entre os haplótipos foram consideradas com a opção *Compute distance matrix*.

Para gerar os mapas de distribuição foram utilizados os programas *GEGraph v2.2.21: Graph for GoogleEarth* (Sgrillo, 2010) e *Google Earth Pro v7.3.0.3832* (Google Inc. 2017). Para ambos os genes foram gerados pontos no mapa com cores diferentes para cada grande grupo definido pela análise anterior.

4.RESULTADOS

Fazendo uma análise das árvores filogenéticas obtidas dos dois genes, foram identificados três grandes grupos monofiléticos contendo praticamente as mesmas amostras em ambas árvores com exceção de duas (uma amostra do Espírito Santo e outra de Mato Grosso do Sul). Para facilitar a identificação, os três grandes grupos receberam as letras X, Y e Z (figuras 5 e 6).

Na árvore obtida para 16S rRNA, os agrupamentos Y e Z apresentam alta probabilidade (probabilidade posterior = 100%) enquanto X apresentava probabilidade menor de 81%. Já na árvore obtida para COII, os agrupamentos com probabilidade de 100% foram X e Z, enquanto Y apresentava probabilidade de 77% (figuras 5 e 6). É muito provável que essa probabilidade menor para X em 16S rRNA e Y em COII sejam causadas pelo fato de conterem as amostras da exceção citada anteriormente na análise.

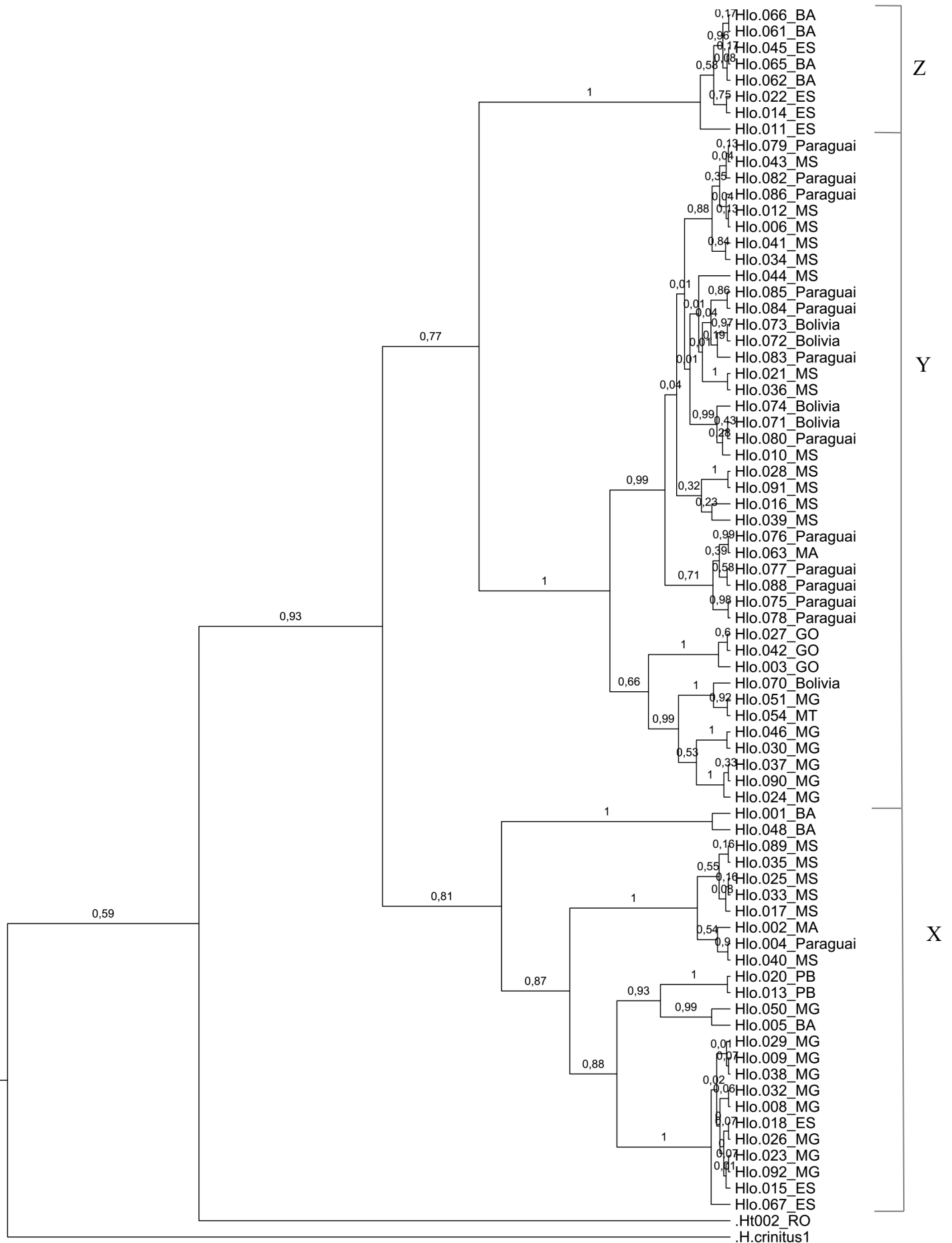


Figura 5 – Árvore filogenética para o gene 16S rRNA com as amostras de *Heterotermes longiceps* utilizadas, além de uma amostra de *H. tenuis* (Ht002_RO) e outra de *H. crinitus* (H.crinitus1) como grupo externo, com grupos representados por X, Y e Z. Suporte de ramo = probabilidade posterior.

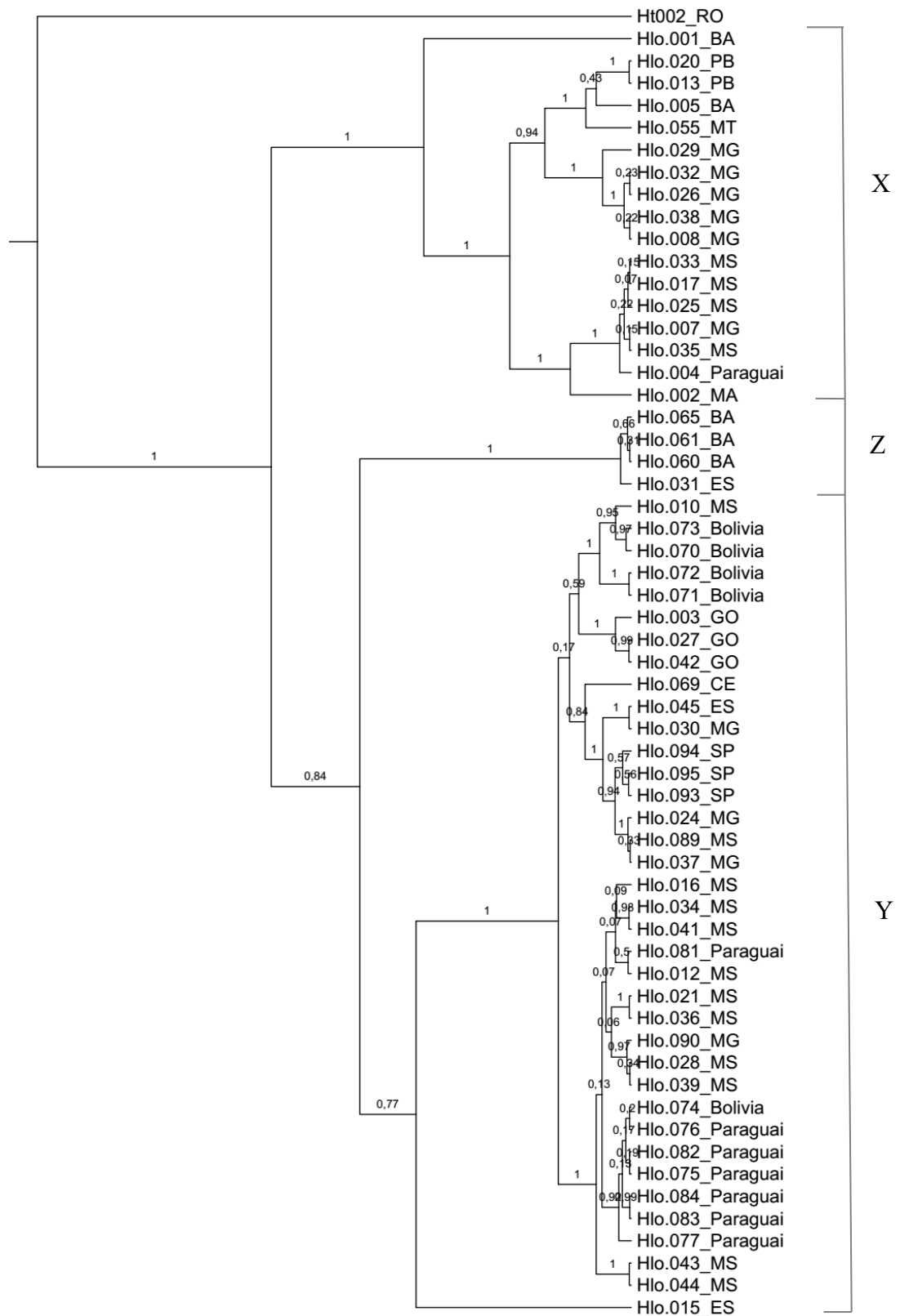


Figura 6 – Árvore filogenética para o gene COII com as amostras de *Heterotermes longiceps* utilizadas, além de uma amostra de *H. tenuis* (Ht002_RO) como grupo externo, com grupos representados por X, Y e Z. Suporte de ramo = probabilidade posterior.

As redes de haplótipos construídas para cada gene corroboraram os grupos X, Y e Z obtidos pela análise das árvores filogenéticas, sendo possível visualizar a separação dos mesmos (figuras 7 e 8).

As Análises de Variância Molecular (AMOVA) foram realizadas par a par com os grupos X, Y e Z para os dois genes; todas as análises mostraram as variações interpopulacionais maiores que as variações intrapopulacionais, corroborando a filogenia e redes de haplótipos obtidas. Para 16S rRNA, a análise X-Y mostrou variação interpopulacional de 61,79% e intrapopulacional de 38,21% ($F_{ST} = 0,6179$); em Y-Z, variação interpopulacional de 77,76% e intrapopulacional de 22,24% ($F_{ST} = 0,7776$); em X-Z, variação interpopulacional de 66,45% e intrapopulacional de 33,55% ($F_{ST} = 0,6645$). Para o gene COII, a análise X-Y mostrou variação interpopulacional de 75,02% e intrapopulacional de 24,98% ($F_{ST} = 0,7502$); em Y-Z variação interpopulacional de 81,08% e intrapopulacional de 18,92% ($F_{ST} = 0,8107$); em X-Z variação interpopulacional de 74,77% e intrapopulacional de 25,23% ($F_{ST} = 0,7477$). Todas análises foram significativas, com $p < 0,001$.

Com a criação dos mapas de distribuição da espécie obtidos, pode ser realizada a visualização da distribuição geográfica de *Heterotermes longiceps* na América do Sul, a partir do posicionamento de todas as amostras utilizadas para análise para ambos os genes neste trabalho (figuras 9 e 10), as quais se localizam em grande parte no Cerrado, Chaco e Mata Atlântica, com pequenas porções localizadas na Caatinga e algumas na Floresta Úmida.

O grupo Z é encontrado exclusivamente na Mata Atlântica (com amostras exclusivamente de Espírito Santo e Bahia), o grupo Y é encontrado predominantemente no Chaco e no sul do Cerrado, com algumas amostras posicionadas na Mata Atlântica e uma única em Floresta Úmida, no Maranhão; e o grupo X, este sendo o que possui uma distribuição mais abrangente, com amostras espalhadas pelo Cerrado, Chaco, Mata Atlântica e Caatinga, também com uma única amostra em Floresta Úmida, no Maranhão (figuras 9 e 10).

Rede de haplótipos 16S rRNA

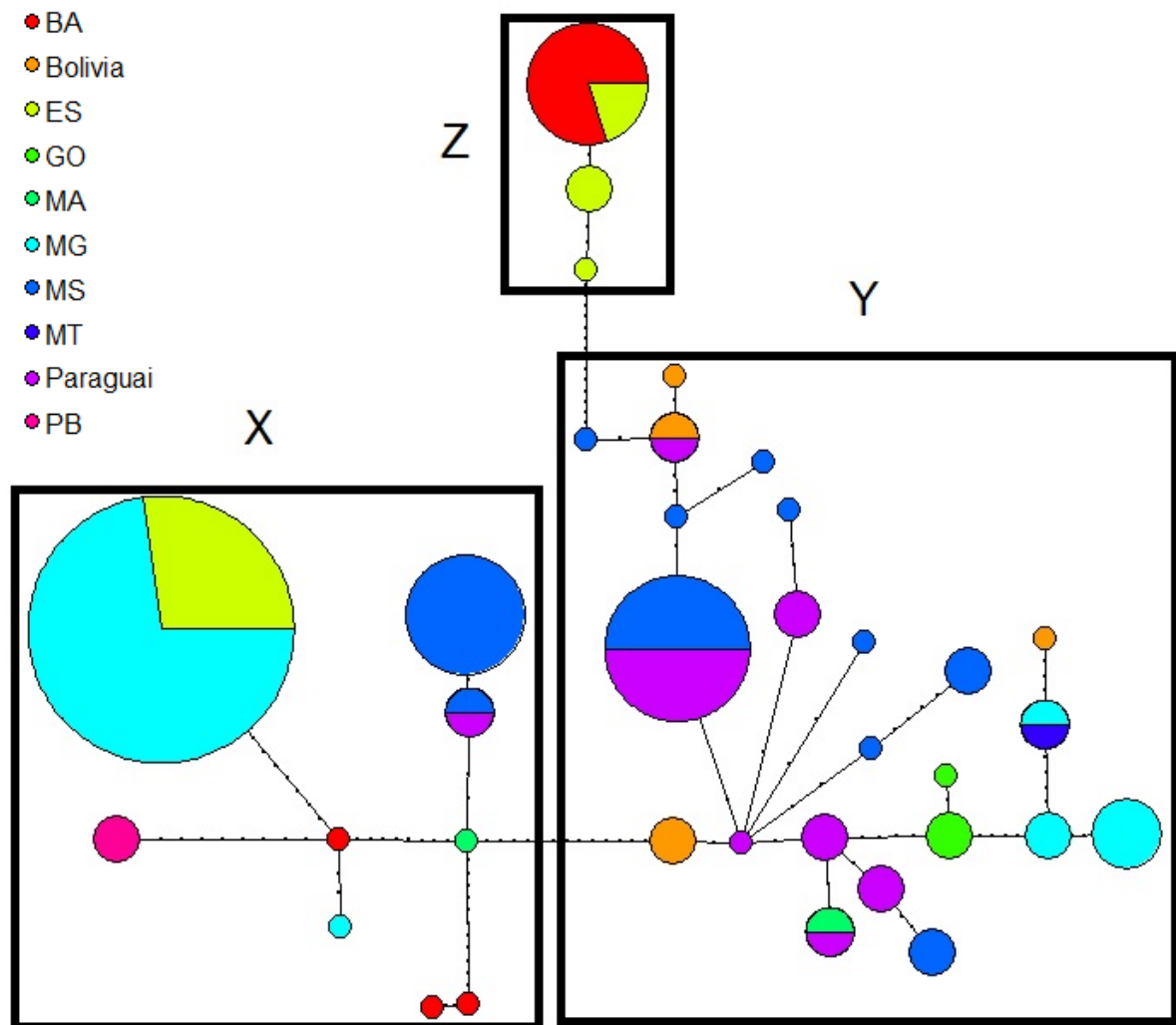


Figura 7 – Rede de haplótipos do gene 16S rRNA para as populações de *H. longiceps*.

Rede de haplótipos COII

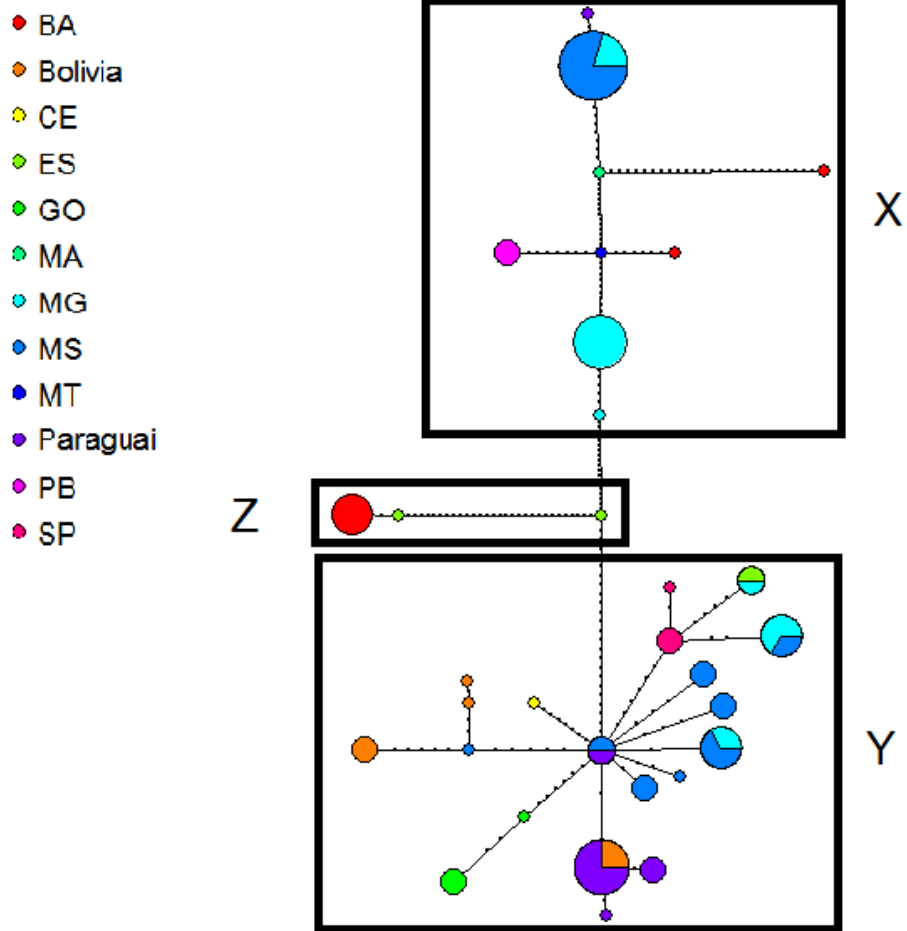


Figura 8 – Rede de haplótipos do gene COII para as populações de *H. longiceps*.

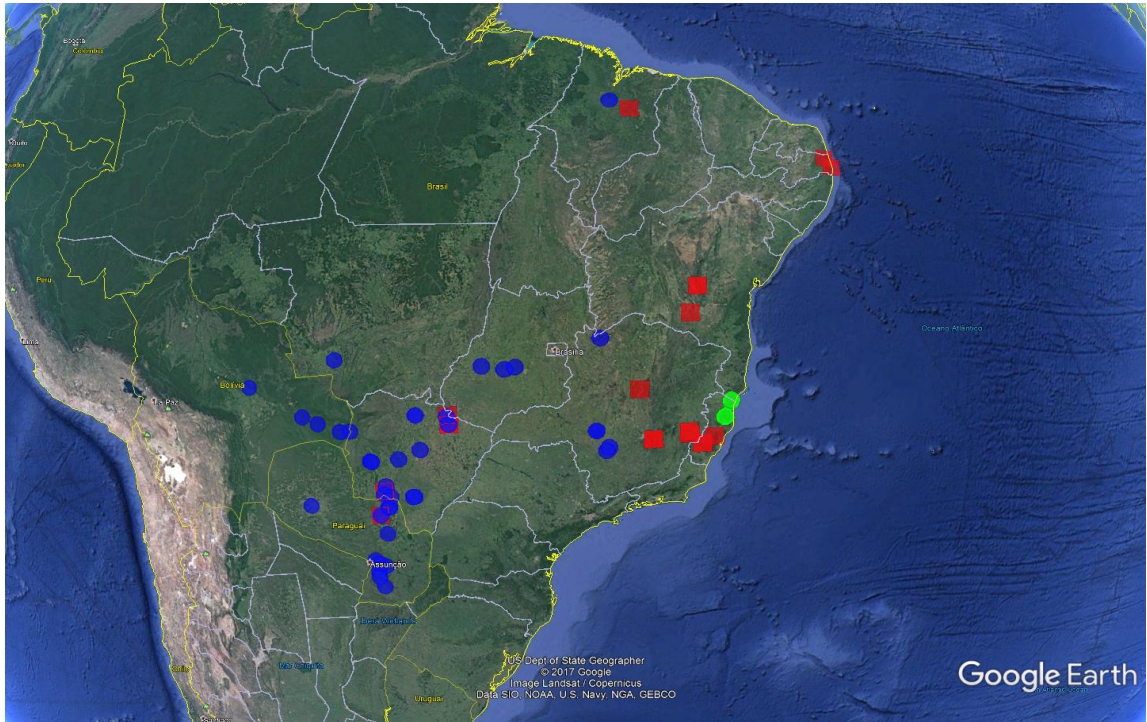


Figura 9 – Mapa de distribuição geográfica das amostras de *Heterotermes longiceps* utilizadas no estudo (gene 16S rRNA) (X – Vermelho; Y – Azul; Z – Verde).

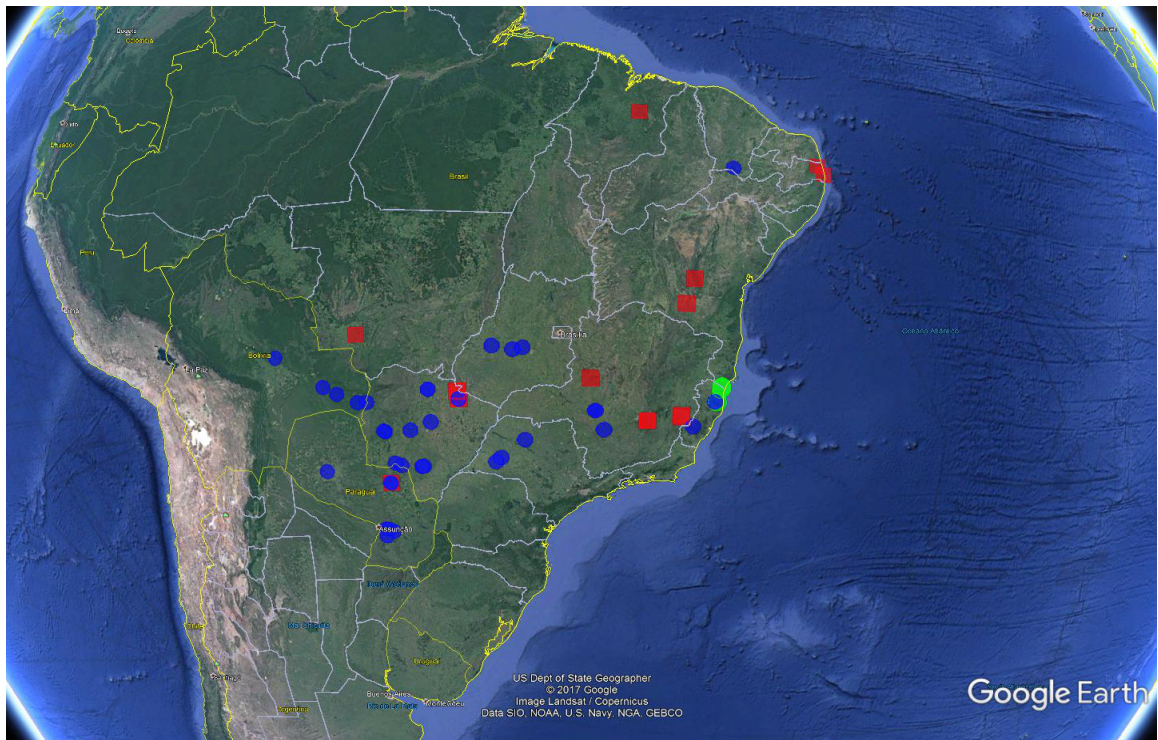


Figura 10 – Mapa de distribuição geográfica das amostras de *Heterotermes longiceps* utilizadas no estudo (gene COII) (X – Vermelho; Y – Azul; Z – Verde).

5.DISCUSSÃO

Considerando os grupos X, Y e Z, duas amostras divergiram entre os grupos para os dois genes estudados. Uma amostra do Espírito Santo e outra do Mato Grosso do sul (Hlo.015_ES e Hlo.089_MS), as quais se localizavam na árvore no grupo X para o gene 16S rRNA e no grupo Y para o gene COII. Talvez por isso a probabilidade nas árvores para os grupos X e Y foram inferiores a 100% (81% e 77% respectivamente), o que não ocorreu para o grupo Z.

Os grupos X, Y e Z também foram corroborados pelas redes de haplótipos, possibilitando a separação dos grupos e também pela AMOVA realizada em ambos os genes, uma vez que as variações interpopulacionais foram consideravelmente maiores que as variações intrapopulacionais em todas as análises. Apesar disso, as análises par a par mostraram que as variações interpopulacionais entre os grupos Y e Z são um pouco maiores que aquelas entre os grupos X e Z (77,76% e 66,45%), o que contraria as árvores obtidas mostrando uma proximidade maior entre Y e Z. Provavelmente, essa diferença se deva ao fato de que para ambos os genes o número de amostras do grupo Z seja relativamente pequeno, ocasionando esta contradição entre a árvore e a AMOVA.

Em relação a localização dos grupos, podemos dizer que o grupo Z, o qual é encontrado exclusivamente na Mata Atlântica com amostras da Bahia e Espírito Santo, é o grupo mais bem definido entre os três. A partir do Plioceno (há cerca de 2 a 5 milhões de anos), a expansão de grandes áreas abertas savânicas (hoje correspondendo a Diagonal de Formações Abertas da América do Sul) isolou a Mata Atlântica das outras florestas sul-americanas, resultando, ao longo do tempo, em um alto nível de diversificação de espécies dentro de seus limites. Além disso, há o aparecimento do vale do Rio Doce, que originou uma das áreas de endemismo, aproximadamente congruente com a distribuição do grupo Z (DaSilva & Pinto-Da-Rocha, 2010). Essa é uma hipótese plausível para o isolamento e diferenciação genética encontrada no grupo Z. Esse padrão é encontrado também em outros grupos, como em algumas espécies de opiliões (Opiliones) (DaSilva & Pinto-Da-Rocha, 2010), em uma espécie de leguminosa (Fabaceae): *Ormosia arborea* (Cardoso & Queiroz, 2010) e em uma espécie de abelha (Hymenoptera): *Partamona sooretamae* (Camargo & Pedro, 2003).

Para os grupos X e Y, a dificuldade para se estabelecer as regiões que os mesmos ocupam aumenta, uma vez que Y tem suas amostras concentradas predominantemente no

Chaco e no parte sul do Cerrado, além de algumas espalhadas pela Mata Atlântica e uma única em Floresta Úmida no Maranhão. Enquanto X, com menor número de amostras em relação a Y, possui uma distribuição ainda mais abrangente, desde o Chaco, passando pelo Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga, e também com uma única amostra em floresta úmida no Maranhão. A princípio, poderíamos hipotetizar que esses grupos se estabeleceram na Diagonal de Formações Abertas da América do Sul e se dispersaram posteriormente para a Mata Atlântica e Floresta Úmida. Essa última, inclusive pode ser uma dispersão atribuída talvez à atividade humana, uma vez que essa espécie é encontrada em plantações de cana-de-açúcar, podem ter sido transportadas para o Maranhão, por exemplo. Entretanto, apenas com os dados obtidos neste trabalho, não é possível oferecer uma explicação mais ampla e com maior probabilidade de ocorrência.

A partir do conhecimento de que há um dimorfismo presente na casta dos soldados de *Heterotermes longiceps*, com diferenças nos tamanhos de cabeça e pronoto, caracterizando soldados maiores e menores, existe a hipótese de que entre as populações encontradas, há a ocorrência de espécies crípticas, dado que os soldados maiores possuem variações em relação ao formato de suas cabeças, diferindo conforme a região onde se encontram. Porém não houve aprofundamento nesta questão, não sendo realizada a discriminação entre esses formatos neste trabalho. Um futuro trabalho poderá tentar correlacionar as variações morfológicas encontradas nos soldados, e as variações moleculares apresentadas aqui.

Mesmo levando em consideração que foram utilizadas apenas uma parte das amostras de *Heterotermes longiceps* disponíveis no acervo de Isoptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), pode-se ter uma visualização da distribuição geográfica da espécie um pouco mais ampla e abrangente que aquela publicada em 2000 por Constantino. Ao compararmos as duas, nota-se na distribuição deste trabalho uma maior distribuição com um maior número de posições ao longo do mapa, com a inclusão de mais alguns estados brasileiros como Maranhão e Ceará, além do Paraguai, porém não havendo amostras da Argentina, como aparecem na publicação de Constantino.

6.CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e discutidos neste trabalho, foi possível complementar a distribuição geográfica de *Heterotermes longiceps*, juntamente com a publicação por Constantino (2000), uma vez que ambas distribuições são semelhantes, porém com adição de algumas localidades como Bolívia, Paraguai, Maranhão, Ceará, centro da Bahia, entre outros.

Além disso, na árvore filogenética foram encontrados três grupos monofiléticos corroborados pelas redes de haplótipos e parcialmente pelas AMOVA realizadas, dado que as proximidades entre esses grupos diferiram do que foi obtido. A hipótese do isolamento da Mata Atlântica, como consequência da expansão de grandes áreas abertas savânicas, gerando alto nível de diversificação das espécies e aumento do fluxo gênico dentro de seus limites, juntamente com a formação de uma área de endemismo causada pela divisão do bioma pelo vale do Rio Doce, se torna a mais plausível para o grupo Z, exclusivo dessa área de endemismo na Mata Atlântica, corroborado por outras espécies com a mesma distribuição. Todavia, para os grupos X e Y, devido a uma grande distribuição pelos diversos biomas na América do sul, não é possível, com apenas os dados obtidos por este trabalho, inferir uma hipótese ampla e detalhada a respeito da história evolutiva para estes grupos.

Espera-se que, futuramente, este trabalho possa auxiliar na busca por um maior conhecimento e maiores informações relacionadas à espécie em questão, *Heterotermes longiceps* pois até o presente momento, há muito pouca informação na literatura sobre a espécie.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVISE, J. C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: pp. 489-522. 1987.

AVISE, J. C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press. 447 Massachusetts. 2000.

BECCALONI, G. W. & EGGLETON, P. Order Blattodea Brunner von Wattenwyl. In: ZHANG, Z. Q. *Animal Biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomy richness*, Vol. 2, pp 199-200. *Zootaxa*. 2011.

BIGNELL, D. E. Termites as soil engineers and soil processors. In: KÖNIG, H & VARMA, A. (eds.). *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates*, pp. 183-220. Berlin Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg, 2006.

CAMARGO, M. F. & PEDRO, R. M. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) – binomia e biogeografia. *Revista brasileira de Entomologia* 47(3). pp. 311-372. 2003

CARDOSO, D. B. O. S. & QUEIROZ, L. P. Caatinga no Contexto de uma Metacomunidade: Evidências da Biogeografia, Padrões Filogenéticos e Abundância de Espécies em Leguminosas. In: CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. (Orgs.). *Biogeografia da América do Sul: padrões e processos*. pp. 241-260. São Paulo: Roca, 2010.

CONSTANTINO, R.: Key to the soldiers of South American *Heterotermes* with a new species from Brazil (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insect Systematics and Evolution* 31: pp. 463-472. 2000.

CONSTANTINO, R. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. *Journal of Applied Entomology* 126, pp. 355-365. Blackwell Verlag, Berlin, 2002.

CONSTANTINO, R. & ACIOLI, A. N. S. Termite Diversity in Brazil (Insecta: Isoptera). In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSARD, L. (eds.). Soil biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems. CAB International. pp. 117-128. Brasília. 2006.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*. vol. 9. n. 8. pp. 772-772. 2012.

DASILVA, M. B. & PINTO-DA-ROCHA, R. História biogeográfica da mata atlântica: opiliões (Arachnida) como modelo para sua inferência. In: CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. (Orgs.). Biogeografia da América do Sul: padrões e processos. pp. 221-238. São Paulo: Roca, 2010.

DJEARNES, M.; KLASS K. D.; PICKER, M. D.; DAMGAARD, J. Phylogeny of cockroaches (Insecta, Dictyoptera, Blattodea), with placement of aberrant taxa and exploration of out-group sampling. *Systematic Entomology*, 37, pp. 65-83. 2012.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. vol. 29 n. 8. pp. 1696-1673. 2012.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*. vol. 32 n. 5. pp. 1792-1797. 2004.

EGGLETON, P. Global patterns of termite diversity. In: ABE, T.; BIGNELL D. E.; HIGASHI, T. (eds.). Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology. pp. 25-51. 2000.

ENGEL, M. S. & KRISHNA, K. Family-group names for termites (Isoptera). *American Museum Novitates*, 3432, pp. 1-9. 2011

EXCOFFIER, L. & LISCHER H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*

Resources. vol. 10. n. 3. pp. 564-567. 2010.

HIGASHI, M. & ABE, T. Global diversification of termites driven by the evolution of symbiosis and sociality. In: ABE, T.; LEVIN, S. A.; HIGASHI, M. Biodiversity – an ecological perspective. pp. 83-112. New York, 1997

INWARD, D.; BECCALONI, G.; EGGLETON, P. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology letters*. vol. 3. n. 3. pp. 331-335. 2007.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. vol. 28. n. 12. pp. 1647-1649. 2012.

KINGMAN, J. F. C. The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications*. vol. 13. n. 3. pp. 235-248. 1982.

KRISHNA, K.; GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, V.; ENGEL, M. S. Treatise on the isoptera of the world. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. v. 377. 491 pp. 2013.

LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LEPAGE, M.; WOLTERS, V.; ROGER, P.; INESON, P.; HEAL, O. & DHILLION, S. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal Of Soil Biology*, 33, pp. 159-193. 1997.

LAWTON, J. H. What do species do in ecosystems? *Oikos*, 71, pp. 367-374. 1994.

LIU, H. & BECKENBACH, A. T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1. pp. 41-52. 1992.

PARADIS E. pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular

approach. *Bioinformatics*. vol. 26. p. 419–420. doi:10.1093/bioinformatics/btp696. 2010.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2016.

RAMBAUT, A. & DRUMMOND, A. J. Tracer. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. v1.4. 2007.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America*, vol. 87. n. 6. pp. 651-701. 1994.

SNYDER, T. E. New termites from Hawaii, Central and South America and the Antilles. *Proceedings of the U.S. National Museum*, 61, pp 1-32, 1922.

SZALANSKI, A. L.; SCHEFFRAHN, R. H.; AUSTIN, J. W.; KRECEK, J.; & SU, N. Y. Molecular phylogeny and biogeography of *Heterotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in the 35 West Indies. *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 97. n. 3. pp. 556-566. 2004.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. vol. 123. n. 3. pp. 585-595. 1989.

VARGO, E. L. & HUSSENER, C. Biology of subterranean termites: insights from molecular studies of *Reticulitermes* e *Coptotermes*. *Annual review of entomology*, 54. pp. 379-403. 2009.

WILSON, E. O. The Termites. In: WILSON, E. O. (eds.). *The Insect Societies*. Belknap Press of Harvard University Press. 548 pp. Cambridge. 1971.

8.ANEXOS

Anexo 1: Códigos das amostras de *Heterotermes longiceps* depositadas no Museu de Zoologia da USP (MZUSP), as quais foram utilizadas para as análises do trabalho com suas respectivas localidades:

Código	Estado/País	Latitude	Longitude	16S rRNA	COII
Hlo.001	BA	-12,9936	-41,358	X	X
Hlo.002	MA	-4,45753	-44,133	X	X
Hlo.003	GO	-16,5133	-49,737	X	X
Hlo.004	Paraguai	-23,0503	-56,728	X	X
Hlo.005	BA	-14,2377	-41,719	X	X
Hlo.006	MS	-21,672	-56,266	X	
Hlo.007	MG	-17,976	-46,381		X
Hlo.008	MG	-20,023	-43,479	X	X
Hlo.009	MG	-20,022	-43,489	X	
Hlo.010	MS	-22,189	-56,088	X	X
Hlo.011	ES	-19,055	-40,147	X	
Hlo.012	MS	-22,067	-56,402	X	X
Hlo.013	PB	-7,139	-34,847	X	X
Hlo.014	ES	-19,012	-40,103	X	
Hlo.015	ES	-20,241	-41,183	X	X
Hlo.016	MS	-20,491	-56,852	X	X
Hlo.017	MS	-18,979	-52,967	X	X
Hlo.018	ES	-20,233	-41,153	X	
Hlo.020	PB	-6,714	-35,176	X	X
Hlo.021	MS	-18,462	-54,515	X	X
Hlo.022	ES	-19,051	-40,066	X	
Hlo.023	MG	-19,699	-41,824	X	
Hlo.024	MG	-19,568	-46,116	X	X
Hlo.025	MS	-18,979	-52,967	X	X
Hlo.026	MG	-20,022	-43,489	X	X
Hlo.027	GO	-16,395	-51,257	X	X
Hlo.028	MS	-20,458	-56,919	X	X
Hlo.029	MG	-19,699	-41,824	X	X
Hlo.030	MG	-20,501	-45,673	X	X
Hlo.031	ES	-18,997	-40,015		X
Hlo.032	MG	-20,023	-43,479	X	X
Hlo.033	MS	-18,606	-53,038	X	X
Hlo.034	MS	-20,076	-54,428	X	X

Hlo.035	MS	-18,559	-52,980	X	X
Hlo.036	MS	-18,462	-54,515	X	X
Hlo.037	MG	-19,568	-46,116	X	X
Hlo.038	MG	-19,814	-41,776	X	X
Hlo.039	MS	-20,491	-56,852	X	X
Hlo.040	MS	-21,921	-56,379	X	
Hlo.041	MS	-22,248	-54,906	X	X
Hlo.042	GO	-16,590	-50,229	X	X
Hlo.043	MS	-22,266	-54,995	X	X
Hlo.044	MS	-20,455	-55,505	X	X
Hlo.045	ES	-18,997	-40,127	X	X
Hlo.046	MG	-20,334	-45,550	X	
Hlo.048	BA	-12,9936	-41,3580	X	
Hlo.050	MG	-17,718	-44,087	X	
Hlo.051	MG	-15,337	-45,820	X	
Hlo.054	MT	-15,619	-58,177	X	
Hlo.055	MT	-15,619	-58,177		X
Hlo.060	BA	-18.2356	-39.8262		X
Hlo.061	BA	-18.2356	-39.8262	X	X
Hlo.062	BA	-18.2356	-39.8262	X	
Hlo.063	MA	-4,0220	-45,0164	X	
Hlo.065	BA	-18.3557	-39.8445	X	X
Hlo.066	BA	-18.2457	-39.8138	X	
Hlo.067	ES	-19,927	-40,5931	X	
Hlo.069	CE	-7,223	-39,498		X
Hlo.070	Bolívia	-16,49354	-62,65294	X	X
Hlo.071	Bolívia	-18,14974	-60,06951	X	X
Hlo.072	Bolívia	-19,00714	-57,74484	X	X
Hlo.073	Bolívia	-18,98723	-58,24453	X	X
Hlo.074	Bolívia	-18,52662	-59,32705	X	X
Hlo.075	Paraguai	-25,38044	-57,20014	X	X
Hlo.076	Paraguai	-25,38066	-57,04971	X	X
Hlo.077	Paraguai	-25,50852	-56,78963	X	X
Hlo.078	Paraguai	-23,94564	-56,49617	X	
Hlo.079	Paraguai	-22,70787	-56,28822	X	
Hlo.080	Paraguai	-22,68366	-56,21476	X	
Hlo.081	Paraguai	-23,05027	-56,72764		X
Hlo.082	Paraguai	-23,05027	-56,72056	X	X
Hlo.083	Paraguai	-22,37082	-60,21817	X	X
Hlo.084	Paraguai	-25,7479	-57,21555	X	X

Hlo.085	Paraguai	-26,05147	-57,24938	X	
Hlo.086	Paraguai	-26,52573	-57,04178	X	
Hlo.088	Paraguai	-25,18497	-57,29831	X	
Hlo.089	MS	-18,979	-52,967	X	X
Hlo.090	MG	-19,568	-46,116	X	X
Hlo.091	MS	-20,458	-56,919	X	
Hlo.092	MG	-20,023	-43,479	X	
Hlo.093	SP	-22,0817	-51,12		X
Hlo.094	SP	-21,8743	-50,858		X
Hlo.095	SP	-21,0092	-49,636		X